

## Nachweis von differenzieller Genexpression

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die eine differenzielle Genexpression in Tumor- und Normalzellen aufweisen.

10

Die genetische Komplexität der zellulären Transformation auf der Ebene der mRNA Expression wurde zuerst vor mehr als 10 Jahren beschrieben (siehe z.B. Groudine und Weintraub, PNAS USA 77 (1980), 5351-5354; Augenlicht et al., Canc. Res. 47 (1987), 6017-6021). Globale Sequenzinformationen hinsichtlich der bei der Pathogenese von humanem Krebs veränderten Genaktivität wurden erst vor Kurzem erhalten, nachdem neue Methoden zur Ermittlung von Genexpressionsprofilen entwickelt wurden (Zhang et al., Science 276 (1997), 1268-1271; Chang et al. Oncogene 16 (1998), 1921-1930; von Stein et al., Nucleic Acids Res. 25 (1997), 2598-2602). Komplexe Genexpressionsprofile, die den zahlreichen tumorspezifischen Zellfunktionen zugrundeliegen, werden zumindest teilweise durch Akkumulierung multipler genetischer Veränderungen in abnormal aktivierten Signaltransduktionswegen und Transkriptionsfaktoren reguliert (Fearon und Vogelstein, Cell 61 (1990), 759-767; Stanbridge, Annu. Rev. Genet. 24 (1991), 615-657).

20

25

Ein wichtiger Aspekt der mehrstufigen Tumorgenese ist die durch Mutationen bewirkte Aktivierung von Mitgliedern der Ras-Genfamilie. Ras-Mutationen stehen im Zusammenhang mit einer ungünstigen Tumorprognose (Mao et al., Cancer Res. 54 (1994), 1634-1637; Sasaki et al., Cancer Res. 53 (1993), 1906-1910; Yaginuma et al., Gynecol. Oncol. 46 (1992), 45-50; Ahnen et al., Cancer Res. 58 (1998), 1149-1158). Ras-Mutationen sind besonders häufig bei sporadischen Tumorerkrankungen

30

von Pankreas, Colon, Lunge und des myeloischen Systems (Boss, *Canc. Res.* 49 (1989), 4682-4689).

Die Ras-Genprodukte sind kleine GTP-Bindeproteine, welche die  
5 Transkription auf globale Weise beeinflussen, indem sie als "Hauptschalter"  
in Signaltransduktionsprozessen wirken, bei denen extrazelluläre Signale  
mit Vorgängen im Zellkern verknüpft werden (Abdellatif et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994), 15423-15426; Malumbres und Pellicer, *Frontiers in Bioscience* 3 (1998), 887-912). In normalen Zellen wird die Konzentration  
10 an Ras-GTP in Reaktion auf die Bindung von Wachstumsfaktoren, Cytokinen  
oder anderen Liganden von membrangebundenen Tyrosinkinaserezeptoren  
transient erhöht. Die Umwandlung in die inaktive, GDP-gebundene Form  
von Ras erfolgt durch seine geringe intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität und  
wird durch zusätzliche Ras-GTPase-Aktivatorproteine (GAP) beschleunigt.  
15 Oncogene, an den Aminosäurekodons 12, 13, 59 oder 61 mutierte Formen  
von Ras, sind gegenüber von GAP-Stimulierung insensitiv und werden  
folglich in ihrem aktiven Zustand festgehalten (zum Überblick siehe  
Malumbres und Pellicer (1998), *supra*, Marshall, *FASEB J.* 9 (1995), 1311-  
1318; Macdonald und McCormick in: *Oncogenes und Tumour Suppressors*,  
20 Eds Peters G. und Vousden K.H., 121-153, Oxford University Press,  
Oxford 1997). Die Ras-GTP Mengen sind selbst in Tumoren erhöht, die  
keine Aktivatormutationen enthalten (Patton et al., *Cancer Res.* 58 (1998),  
2253-2259; Clark und Der, *Breast Cancer Res. Treat.* 35 (1995), 133-  
144). Beim Fehlen von intrinsischen Mutationen kann der Ras-  
25 Signaltransduktionsweg durch inaktivierende Mutationen des Ras-  
Regulators NF-1 GAP bei der Neurofibromatose Typ I (DeClue et al., *Cell*  
69 (1992), 265-273), durch Komplexbildung von stromaufwärts wirkenden  
Effektorproteinen mit der Bcr-Abl Proteintyrosinkinase in chronischer  
myelogener Leukämie (Puil et al., *EMBO J.* 13 (1994), 764-773) und durch  
30 direkte Assoziierung von Ras mit dem STP-C488 Protein des DNA  
Tumovirus Herpes saimiri (Jung und Desrosiers, *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995),  
6506-6512) stimuliert werden.

Auf der zellulären Ebene werden zwei hauptsächliche Veränderungen als Ergebnis der Ras-Aktivierung beobachtet: Mitogenese und Reorganisation des Cytoskeletts. Eine permanente Aktivierung von Ras bewirkt eine Verstärkung der normalen zellulären Reaktion. Essentielle Signale für die zelluläre Transformation, Invasivität, Angiogenese und Metastasierung werden mittels verzweigter Signalwege stromabwärts von Ras transduziert. Diese Signalwege umfassen die Raf/Mek/Erk Kaskade von cytoplasmatischen Kinasen, den die kleinen GTP-Bindeproteine Rac/Rho beinhaltenden Signalweg, den PI3 Kinase Signalweg u.a. Über diese Signalwege werden verschiedene Transkriptionsfaktoren wie etwa Elk1, SRF, Jun, ATF2 und NFkB stimuliert (zur Übersicht siehe z.B. Khosravi et al., Adv. Cancer Res. 72 (1998), 57-107).

Angesichts der Komplexität der nichtlinearen Ras-Signalgebung und der überaus großen Anzahl potentieller Targets besteht ein großes Bedürfnis, ein Verfahren bereitzustellen, das eine Bestimmung der mit einer Ras-Transformation assoziierten transkriptionellen Veränderungen erlaubt. Weiterhin sollte dieses Verfahren auch für die Analyse transkriptioneller Veränderungen verursacht durch andere Prozesse einsetzbar sein.

Zur Lösung dieses Problems wurden die Konzentrationen bzw. Mengen einzelner Transkripte in phänotypisch normalen 208 F Rattenfibroblasten (Quade, Virology 98 (1979), 461-465) mit denjenigen in der aus 208 F-Zellen abgeleiteten H-Ras transformierten Zelllinie FE-8 (Griegel et al., Int. J. Canc. 38 (1986), 697-705) mittels einer auf PCR-basierenden cDNA Subtraktionsmethode, der subtraktiven Suppressionshybridisierung (Diatchenko et al., PNAS USA 93 (1996), 6025-6030) bestimmt. Dieses Verfahren erlaubte überraschenderweise eine effiziente Isolierung bekannter Genen - und von besonderer Bedeutung - die Isolierung von neuen Sequenzen. Die beiden verwendeten Zelllinien sind nahe verwandte, quasidiploide Zelllinien, um transkriptionelle Veränderungen aufgrund struktureller und numerischer chromosomaler Aberrationen, die nicht direkt

mit der Ras induzierten Transformation im Zusammenhang stehen, möglichst gering zu halten. Die auf diese Weise nach Vorwärts- und Rückwärts-Subtraktion erhaltenen cDNA Fragmente (n=1257) wurden sequenziert und in einem Array angeordnet. Nach reverser oder konventioneller Northern Analyse wurde ein H-Ras spezifisches Expressionsprofil umfassend neue Sequenzen (n=45), exprimierte Sequence Tags (n=104) und bekannte Gene (n=244) etabliert. Anschließend wurde dieses Genprofil zum Vergleich der mRNA Expression zwischen H-Ras transformierten 208 F-Zellen und mit Zellen verwendet, die durch zwei andere tumorassoziierte Ras-Isoformen K-ras und N-Ras, transformiert waren. Darüber hinaus wurden Targetgene (n=61) identifiziert, deren transkriptionelle Veränderungen durch den Ras/Raf/Mek-Signalweg reguliert sind.

Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von transkriptionellen Veränderungen in einer Zelle, insbesondere in einer Säugerzelle wie etwa einer Nagetierzelle oder einer menschlichen Zelle, assoziiert mit einer physiologischen Veränderung, z.B. einer Transformation, vorzugsweise einer Ras-vermittelten Transformation, gegenüber einer anderen Zelle, die diese bestimmte physiologische Veränderung nicht aufweist. Das Verfahren zur differenziellen Transkriptionsanalyse ist dadurch gekennzeichnet, dass man mRNA aus einer ersten Zelle und einer zweiten Zelle gewinnt, eine subtraktive Suppressionshybridisierung mit der gewonnen mRNA durchführt und eine Population von in beiden Zellen differenziell exprimierten Genen identifiziert, wobei sich die erste und die zweite Zelle bezüglich einer zu untersuchenden physiologischen Veränderung unterscheiden. Vorzugsweise umfasst das Verfahren weiterhin eine Verifizierung der differenziellen Expression, vorzugsweise durch reverse oder/und konventionelle Northern Blot Analyse.

Als erste Zelle wird vorzugsweise eine transformierte Zelle und als zweite Zelle eine nichttransformierte Zelle verwendet. Besonders bevorzugt wird

als erste Zelle eine Ras-transformierte Zelle und als zweite eine nichttrans-  
formierte Zelle verwendet, wobei als Ras-transformierte Zelle eine  
insbesondere eine mit einem mutierten Ras-Genprodukt transformierte  
Zelle, beispielsweise eine H-Ras-, K-Ras- oder N-Ras-transformierte Zelle  
5 verwendet wird.

Die erste Zelle und die zweite Zelle stammen vorzugsweise von dergleichen  
Spezies, insbesondere einem Säuger wie etwa Ratte, Maus, Mensch etc.  
Weiterhin stammen die erste Zelle und die zweite Zelle bevorzugt vom  
10 gleichen Zelltyp, beispielsweise Fibroblasten. Darüber hinaus hat es sich als  
günstig erwiesen, eine erste Zelle und zweite Zelle zu verwenden, die im  
wesentlichen keine chromosomalen Aberrationen aufweisen, die das  
Muster der durch die zu untersuchende physiologische Veränderung, z.B.  
die Ras-Transformation hervorgerufenen differenziellen Genexpression  
15 möglicher-weise verfälschen könnten.

Die subtraktive Suppressionshybridisierung ist eine auf Nukleinsäure-  
Amplifikation, z.B. PCR-basierende Technik, die einen Reversen  
Transkriptionsschritt umfasst, bei dem die differenziell exprimierten  
20 Transkripte in cDNA Moleküle umgeschrieben werden. Eine weitere  
Charakterisierung der differenziell exprimierten Gene kann eine zumindest  
partielle Sequenzanalyse der identifizierten cDNA Moleküle und einen  
Abgleich mit Sequenzdatenbanken wie Genbank, EMBL oder EST  
umfassen.

25 Durch das Verfahren wurden bislang 1257 cDNA Sequenzen durch  
Vorwärts-Subtraktion (normale 208 F-Zellen minus transformierte FE-8  
Zellen) und Rückwärts-Subtraktion (transformierte FE-Zellen minus normale  
208 F Zellen) erhalten. Daraus wurden insgesamt 823 individuelle  
30 Sequenzen identifiziert, von denen 427 bekannten Genen und 303  
exprimierten Sequence Tags entsprechen. 93 Sequenzen sind bislang  
unbekannt. Die differenzielle Expression von 393 (47,8 %) Genen und

Genfragmenten wurde durch Northern Analyse verifiziert. Darüber hinaus wurden 236 cDNA Sequenzen entsprechend in nur sehr geringen Konzentrationen vorkommender Transkripten erhalten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit weist ein Anteil dieser Sequenzen ( $> 100$ ) ebenfalls eine differenzielle Expression auf.

Die durch das Verfahren mittels cDNA Subtraktion erhältliche Population von vorzugsweise mindestens 100 differenziell exprimierten Genen kann auf neue Weise, z.B. durch Anordnung auf Arrays, zur Untersuchung der Beziehung zwischen einem Signalgebungsmolekül und einem Transkriptionstarget auf der Ebene des Transkriptoms eingesetzt werden. Auf diese Weise kann die Anzahl von biologisch relevanten Targets in den untersuchten Zellen auf eine beschränkte Anzahl von Genen verringert werden, die dann gründlich auf ihre Beteiligung an spezifischen Aspekten der jeweiligen physiologischen Veränderung, z.B. der Tumorgenese untersucht werden kann.

Ein Gegenstand der Erfindung ist eine Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine differenzielle Expression in Tumorzellen und normalen Zellen zeigt, umfassend

- (a) eine der in Fig. 11 gezeigten Nukleinsäuresequenzen,
- (b) Teilsequenzen davon mit einer Länge von mindestens 50, vorzugsweise mindestens 100 und besonders bevorzugt mindestens 200 Nukleotiden,
- (c) eine mit einer Sequenz aus (a) oder/und (b) unter stringenden Bedingungen hybridisierende Sequenz, oder/und
- (d) eine zu einer Sequenz aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre Sequenz.

Erfindungsgemäß werden Nukleinsäuren, z.B. Gene, cDNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, bereitgestellt, deren Expression in der Ras-transformierten Zelle erhöht im Vergleich zur nichttransformierten Zelle ist. Diese

Nukleinsäuren umfassen vorzugsweise die entsprechenden in Fig. 11 angegebenen Nukleinsäuresequenzen (T-Klone) oder Teilsequenzen davon mit einer Länge von mindestens 50, vorzugsweise mindestens 100 und besonders bevorzugt mindestens 200 Nukleotiden.

5

Weiterhin werden Nukleinsäuren, z.B. Gene, cDNA-Moleküle oder RNA-Moleküle, bereitgestellt, deren Expression in der Ras-transformierten Zelle verringert im Vergleich zur nichttransformierten Zelle ist. Diese Nukleinsäuren umfassen vorzugsweise die entsprechenden in Fig. 11  
10 angegebenen Nukleinsäuresequenzen (N-Klone) oder Teilsequenzen davon mit einer Länge von mindestens 50, vorzugsweise 100 und besonders bevorzugt mindestens 200 Nukleotiden.

15

Neben den in Fig. 11 angegebenen Nukleinsäuresequenzen und Teilsequenzen davon umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, die unter stringenten Bedingungen mit einer der in Fig. 11 angegebenen Nukleinsäuresequenzen oder Teilsequenzen davon (wie zuvor angegeben) hybridisieren. Der Begriff "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird wie bei Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual,  
20 Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) verwendet. Gemäß vorliegender Erfindung spricht man daher von einer Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, wenn nach Waschen für eine Stunde mit 1 x SSC und 0,1% SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C, insbesondere für 1 h in 0,2 x SSC und 0,1% SDS bei  
25 55°C, vorzugsweise bei 62°C und besonders bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit einer unter Fig. 11 gezeigten Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleotidsequenz wird von der vorliegenden Erfindung umfasst.

30

Weiterhin werden von der vorliegenden Erfindung auch zu den in Fig. 11 gezeigten Nukleinsäuresequenzen homologe Sequenzen, insbesondere

homologe Sequenzen aus anderen Spezies, vorzugsweise humane Sequenzen, z.B. Gene, cDNA-Moleküle oder RNA-Moleküle oder allelische Variationen dieser Sequenzen erfasst. Derartige Sequenzen hybridisieren vorzugsweise unter den oben angegebenen Bedingungen mit den in Fig. 11  
5 gezeigten Nukleinsäuresequenzen. Bevorzugte Beispiele für humane Sequenzen sind in Fig. 12 dargestellt.

Von den in Figur 11 und Fig. 12 gezeigten Sequenzen ist lediglich von den Nukleinsäuren N5, N9, N15, N18, N52, N132, N159, N179, T26, T51,  
10 T55, T56, T57 und T99 (Fig. 11) bzw. 6 und 33 (Fig. 12) auf Basis des Suchkriteriums einer 95%igen Sequenzhomologie ein Zusammenhang mit der Ras-Signaltransduktionskaskade bekannt. Von den übrigen Sequenzen ist nach Kenntnisstand der Anmelderin ein derartiger Zusammenhang nicht bekannt. Diese Sequenzen stellen daher eine im Rahmen der vorliegenden  
15 Erfindung bevorzugte Ausführungsform dar.

Die erfindungsgemäßen Gene, bzw. deren Transkripte, cDNAs, aber auch deren Genprodukte eignen sich als Target für diagnostische oder therapeutische Zwecke, insbesondere für die Tumordiagnostik oder die  
20 Tumorthapie. "Target" bedeutet in diesem Zusammenhang den Nachweis bzw. die Beeinflussung der Menge, Aktivität oder/und Lokalisierung der Nukleinsäure oder deren Genprodukts. Diagnostische Anwendungen umfassen eine qualitative oder quantitative Bestimmung des Vorhandenseins, der Menge, der Aktivität oder/und der Lokalisierung der  
25 Nukleinsäure oder des Genprodukts nach bekannten Methoden. Therapeutische Anwendungen umfassen beispielsweise eine Modulation der Expression der Nukleinsäure, z.B. durch gentherapeutische Verabreichung der Nukleinsäure oder eine Verabreichung von Antisense-RNA oder Ribozymen. Weiterhin kann auch die Menge, Aktivität oder/und  
30 Lokalisierung des von der Nukleinsäure kodierten Polypeptids z.B. durch Verabreichung des Polypeptids oder eines Aktivators davon oder durch Verabreichung eines gegen das Polypeptid gerichteten Antikörpers, z.B. in



Form eines Konjugats mit Radioisotopen oder cytotoxischen Substanzen, oder eines Inhibitors des Polypeptids, z.B. einer niedermolekularen Substanz, moduliert werden.

5 Weiterhin bedeutet "Target" auch die Verwendung der Nukleinsäuren bzw. davon kodierter Genprodukte zur Identifizierung neuer Wirkstoffe in einem Screening-Verfahren, z.B. in einem Hochdurchsatz-Screening-Verfahren in zellulären oder molekularen Systemen. Zelluläre Screeningsysteme umfassen üblicherweise Zellen mit einer erhöhten Expression der Target-  
10 Nukleinsäure, während molekulare Screeningsysteme die Verwendung der Nukleinsäure bzw. des Genproduktes in zellfreier Form, z.B. in aufgereinigter und isolierter Form umfassen. Beispielsweise können aus den in Fig. 11 oder/und Fig. 12 gezeigten Sequenzen bzw. aus davon nach Standardmethoden abgeleiteten "Volllänge"-Sequenzen, z.B. cDNAs, Proteine abgeleitet werden, und diese Proteine bzw. Teile davon exprimiert  
15 werden, insbesondere wenn extrazelluläre oder/und transmembrane Domänen identifiziert werden. Gegen diese Domänen gerichtete Wirkstoffe können als Therapeutikum oder Diagnostikum eingesetzt werden. Beispielsweise können Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper, gegen diese Domänen erzeugt und gegebenenfalls nach Chimärisierung  
20 oder/und Humanisierung als Wirkstoffe verwendet werden. Bei cytosolischen Targetpeptiden oder -polypeptiden werden vorzugsweise Screens nach niedermolekularen Wirkstoffen durchgeführt.

25 Außerdem werden Sequenzen offenbart, die eine differenzielle Expression in von unterschiedlichen Ras-Isoformen transformierten Zellen zeigen. So wurde die Genexpression in unterschiedlichen Zellen untersucht, die jeweils eine der drei prädominanten mutierten Ras-Isoformen H-Ras, K-Ras und N-Ras exprimieren. Dabei wurde ein identisches Muster von positiven und  
30 negativen Veränderungen für 237 Gene (90%) gefunden. 26 Gene zeigten jedoch ein Isoform-spezifisches Expressionsmuster.

Außerdem werden Sequenzen offenbart, die eine differenzielle Expression in mit einer Wirksubstanz behandelten Zellen und unbehandelten Zellen, insbesondere Tumorzellen, zeigen. Als Wirksubstanzen können grundsätzliche beliebige Stoffe, insbesondere pharmakologisch aktive Stoffe, die einen Einfluss auf die Transkription in der Zelle zeigen, verwendet werden. Bevorzugte Beispiele für Wirkstoffe sind Modulatoren, d.h. Aktivatoren oder Inhibitoren der Tumorgenese. Besonders bevorzugt werden Modulatoren der Ras-Aktivität verwendet.

10 In dieser Ausführungsform der Erfindung kann der Einfluss von Wirksubstanzen, die der ersten oder/und zweiten Zelle zugegeben worden sind, auf die Population der differenziell exprimierten Gene getestet werden. Bei Zugabe des MAP-Kinaseinhibitors PD98059 zu einer Ras-transformierten Zelle wurde beispielsweise gefunden, dass die Transkription von 61 Genen im Vergleich zu unbehandelten Zelle deutlich verringert und  
15 zumindest teilweise auf die Höhe vor der Transformation zurückgeführt werden konnte.

Die Sensitivität der transkriptionellen Modulation dieser Gene hinsichtlich der Inhibierung einer Signalgebung durch die MAP-Kinase definiert eine Unterklasse von Ras-sensitiven Targets, welche durch Substrate von Erk1/Erk2 reguliert werden und voraussichtlich für die transformierenden Eigenschaften der Zelle direkt verantwortlich sind. Die 116 durch den Inhibitor nicht beeinflussten Gene werden vermutlich durch MEK-unabhängige Signaltransduktionswege stromabwärts von Ras reguliert.  
20  
25

Überraschenderweise konnte eine unerwartet hohe Anzahl an Sequenzen identifiziert werden, welche einer malignen Proliferation entgegenwirken können. Bei diesen durch die differenzielle Expressionsanalyse identifizierten Sequenzen handelt es sich um Tumorsuppressorgene der Klasse II, da sie kein primäres Ziel von tumorinitiierenden Mutationen sind. Stattdessen zeichnen sich die Gene der Klasse II dadurch aus, dass ihre  
30

Expression durch Gene der Klasse I reguliert wird, die für transkriptionelle Regulatoren wie etwa onkogene Transkriptionsfaktoren oder Repressoren kodieren, und der Gegenstand einer Mutation sein können. Eine Erhöhung der Expression von Transformationssuppressorgenen der Klasse II kann den transformierten Phänotyp von Ras exprimierenden Zellen blockieren (Sers et al., J. Cell. Biol. 136 (1997), 935-944). Somit besteht eine funktionelle Verbindung zwischen einer permanent aktivierten Ras-Signalgebung und der Repression der Klasse II Suppressoraktivität.

Bemerkenswerterweise konnten mehr als zehn negative Wachstumsregulatoren in einem unabhängigen Expressionsprofil durch Subtraktion von 208 F cDNA (Driver) von REF-52 cDNA (Tester) gefunden werden. REF-52 Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie in Reaktion auf H-Ras-Expression ein vorzeitiges Alterungsprogramm aktivieren (Serrano et al., Cell 88 (1997), 593-602) und hohe mRNA-Konzentrationen der negativen Regulatoren aufweisen, die in 208 F-Zellen nicht exprimiert werden.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert.

20

#### Beschreibung der Figuren

Figur 1 zeigt eine Übersicht der nach Vorwärts- und Rückwärts-Subtraktion erhaltenen DNA-Bibliotheken. Sequenzanalyse: Homologieuntersuchungen wurden unter Verwendung des BLASTN-Programms gegen die NCBI Non-Redundance und EST-Datenbanken durchgeführt. Übereinstimmungen gegenüber einer Datenbanksequenz wurden als eine Sequenzidentität von > 95% über eine Region von 150 bis 1000 bp abhängig von der cDNA-Insertlänge definiert.

25

30

Figur 2 zeigt eine Übersicht von differenziell exprimierten Sequenzen bestätigt durch Reverse (R) und/oder konventionale Northern Blot Analyse (N, T). Sequenzidentität, Spezies und Zugriffsnummer sind gemäß der besten Übereinstimmung in der Blast-Analyse aufgelistet. Speziesabkürzungen: H, human; M, Maus; R, Ratte; C, Huhn; HA, Hamster; X, *Xenopus laevis*. Redundanz bedeutet die Anzahl an individuellen cDNA-Klonen, die einem übereinstimmenden Gen in der BLAST-Analyse entsprechen. Die Nummern N1-N70 entsprechen den durch Ras-Transformation herabregulierten Genen wie durch Northern Blot in Fig. 7 gezeigt. Die Nummern T1-T74 entsprechen heraufregulierten Genen wie in Fig. 7 gezeigt. Die Mengen an mRNA wurden densitometrisch analysiert. Die angegebenen Zahlen entsprechen dem Verhältnis von densitometrischen Werten (Volumenanalyse) von 208F gegenüber FE-8 mRNA (Ausmaß der Herabregulierung, linker Abschnitt) und von FE-8 gegenüber 208F mRNA (Ausmaß der Heraufregulierung, rechter Abschnitt). Ein Wert von 30 oder mehr zeigt, dass ein Transkript in einer der untersuchten Zellen nicht nachweisbar war.

Die folgenden cDNA Fragmente waren bei Reverser oder konventioneller Northernblot Analyse nicht nachweisbar. 208 F spezifische Klone: p190-B (Zugriffs-Nr. U170032, SLIT-2 (AF141386), Slugh Zinkfinger (U79550), Semaphorin E (AB000220), GLE-1 (AF058922), TID1 (AF061749), ARF-GEP1 (AF023451), DEAD Box RNA Helicase-artiges Protein (NM-004398); FE-8-spezifische Klone: G21 Protein (AF131207), p68 RNA Helicase (X65627), LZTR-1 (D38496), Smcx (Z29651), SHMT (L11932) und CRK SH3-Protein/C3G (D21239).

- 13 -

Figur 3 zeigt Ras-Targetgene, die auf eine MEK-Inhibierung durch PD98059 reagieren. Linke Spalte: präferentiell in normalen 208 F-Zellen exprimierte und bei H-ras-Transformation herabregulierte Gene; rechte Spalte: bei H-ras-Transformation heraufregulierte Gene. Transkriptmengen: 0, mRNA bei Northern Blots mit Gesamt RNA nicht nachweisbar; + bis + + +, niedrige, mittlere oder hohe mRNA Expression. Die als a bis e bezeichneten Sequenzen wurden bei den in Fig. 8 gezeigten Northern Blots als Sonden verwendet.

Figur 4 zeigt transkriptionelle Ras-Isoformen spezifische Änderungen. Transkriptmengen: 0, mRNA nicht nachweisbar in Northern Blots mit Gesamt RNA, + bis + + + +, geringe, mittlere, hohe oder sehr hohe RNA-Expression. Die als f bis i bezeichneten Sequenzen wurden in den in Fig. 8 gezeigten Northern Blots als Sonden verwendet.

Figur 5 zeigt Eigenschaften von Zellen, die für die Identifizierung von Ras-Transformationstargets verwendet wurden.

- a) Morphologie von normalen 208 F Fibroblasten und H-Ras-transformierten FE-8 Zellen unbehandelt und mit dem MEK-Inhibitor (PD98059) inkubiert. Phasenkontrast, 100fache Vergrößerung.
- b) DNA Histogramm von 208F und FE-8 Zellen erhalten mit Durchflusszytometrie. Abszisse: Fluoreszenzintensität; Ordinate: gezählte Zellen; die Zahlen beziehen sich auf den Anteil von Zellen (%) in verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Die 208 F und FE-8 Rattenzellen zeigten einen pseudodiploiden Karyotyp ohne größere numerische chromosomale Aberrationen.

- c) ankerunabhängige Proliferation von Zellen in Kulturen auf Poly-Hema-beschichteten Oberflächen. Ordinate: Absorption bei 490 nm.
- d) Westerblot-Analyse der 21-Ras Expression und
- e) der Phospho-p44/42 MAPK Expression.

Figur 6 zeigt eine Reverse Northern Blot Analyse von subtrahierten cDNA Fragmenten. Repräsentatives Beispiel von 93 angeordneten ESTs, die aus einer 208F - FE-8 subtrahierten Bibliothek erhalten wurden (N-Klone).

- a) Hybridisierungssonde:  $^{32}\text{P}$ -markierte 208 F cDNA,
  - b) Hybridisierungssonde:  $^{32}\text{P}$ -markierte FE-8 cDNA.
- Kontroll-DNAs: Klonierungsvektor PCR2.1 (Filterposition D22), GAPDH (D23), H-Ras (D24).

Figur 7 zeigt eine konventionelle Northern Blot Analyse von präferentiell exprimierten Genen. Obere Hälfte, Klone N1-N70 entsprechend in H-ras-tranformierten FE-8 Zellen herabregulierten Genen wurden als Hybridisierungssonden verwendet. Untere Hälfte, Klone T1-T74 entsprechend in FE-8 Zellen heraufregulierten Genen wurden als Hybridisierungssonden verwendet. Linke Spalten, einzelne Blots von Gesamt RNA aus normalen 208 F Zellen, rechte Spalten, aus FE-8 RNA. Schwarze Pfeile zeigen die korrekte Transkriptgröße wie in der Literatur beschrieben. Weiße Pfeile zeigen aberrante Transkripte. Kontrollhybridisierungen erfolgten mit einer GAPDH Sonde (A bis E). Originalgröße der Northern Filter: 3 x 1 cm.

Figur 8 zeigt repräsentative Beispiele für die Wirkungen des Ras/Raf/Mek Signaltransduktionswegs und verschiedener Ras-Isoformen auf die Targetgentranskription.

- a bis e) Northern Blot Analyse der mRNA-Expression in normalen 208 F Fibroblasten, H-ras-transformierten A-Zellen und mit PD98059 behandelten FE-8 Zellen.
- 5 f bis i) Northern Blot Analyse der mRNA Expression in normalen 208 F Zellen und in mit mutiertem H-Ras, K-Ras und N-Ras transformierten 208F Zellen.
- 10 k) MMP-3, repräsentatives Beispiel für ein Gen ohne signifikante differenzielle Expression.

Figur 9 zeigt eine Charakterisierung von mit Isoformen des Ras Onkogens transformierten Zellen.

- 15 a) Morphologie von normalen 208F Fibroblasten, H-Ras-transformierten FE-8 Zellen, K-Ras und N-Ras transformierten 208F Zellen. Phasenkontrast, 100fache Vergrößerung.
- 20 b) Ankerunabhängige Proliferation von Zellen in Kulturen auf Poly-Hema-beschichteten Oberflächen. Ordinate: Absorption bei 490 nm.
- c) Westerblot-Analyse der Ras-Expression.

Figur 10 zeigt repräsentative Beispiele einer differenziellen mRNA Expression in stabil mit K-Ras transformierten Rattenovarien-Oberflächenepithelzellen und in konditionell H-Ras-transformierten Fibroblasten. Links: Northernblot Analyse von Gesamt RNA aus normalen Rattenovarien-Oberflächenepithelzellen (ROSE199) und 2 K-Ras transformierten Derivaten (ROSE A2/1 K-Ras und ROSE A2/5 K-Ras). Rechts: RNA aus 208F Zellen, stabil transformierten FE-8 Zellen und konditional transformierten 208F-iHRas-Zellen vor (- IPTG) und nach 4 Tagen einer Ras-Induzierung (+ IPTG).

Figur 11 zeigt die Nukleotidsequenzen von cDNAs entsprechend den identifizierten differenziell exprimierten Transkripten. Neben den konkret angegebenen Sequenzen beinhaltet Fig. 11, selbstverständlich auch eine Offenbarung bezüglich der Komplementärsequenzen.

Figur 12 zeigt die Nukleotidsequenzen von homologen menschlichen cDNAs. Auch Fig. 12 beinhaltet eine Offenbarung bezüglich der Komplementärsequenzen.

Figur 13 zeigt eine Zuordnung der Fig. 11 gezeigten Nukleotidsequenzen (Ratte) zu den homologen menschlichen Sequenzen gemäß Figur 12.

SEQ. ID NO. 1 - 885: die Sequenzen SEQ. ID NO. 1,2,3 ... 335 entsprechen den Sequenzen 1,2,3 ... 335 gemäß Fig. 12. Die Sequenzen SEQ. ID NO. 336, 337, 338 ... 632 entsprechen den Sequenzen N 1, N2, N3 ... N297 gemäß Fig. 11 und die Sequenzen SEQ. ID NO. 633, 634, 635 ... 885 entsprechen den Sequenzen T1, T2, T3 ... T253 gemäß Fig. 11.

### Beispiele

#### 1. Methoden

##### 1.1 Zellkultur und DNA-Transfektionen

Zellen wurden in Dullbeco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert. Die Transfektionen erfolgten durch Calciumphosphat-Präzipitation wie bei Griegel et al. (Int. J. Canc. 38 (1986), 697-705) beschrieben. Zur Etablierung von N-Ras



Transformanten wurden 208F Zellen mit pcDneo und dem N-Ras (G12D) Onkogen (Souyri et al., Virology 158 (1987), 69-78) cotransfiziert und in DMEM mit 400  $\mu$ g/ml G418 selektioniert. Das K-Ras (C12V) Onkogen wurde aus der humanen Colonkarzinomzelllinie SW480 kloniert und in 208F  
5 Zellen transfiziert. 208F-K-Ras Zellen wurden aus morphologisch transformiertem Transfektanten isoliert. FE-8 Zellen sind G418-resistente H-ras (G12V)-transformierte Derivate von 208F (Griegler et al., supra).

Zur Herstellung von subtrahierten Bibliotheken wurden Zellen aus einem  
10 frühen Isolat der FE-8 Zelllinie verwendet. 208F-Zellen wurden in Kultur nicht länger als 30 Tage nach Transfektion gehalten. K-Ras transformierte Rattenovarien-Oberflächenepithelzellen wurden nach Transfektion von ROSE199 Zellen (Adams und Auersperg, Exp. Cell Biol. 53 (1985), 181-188) mit K-Ras (C12 V) isoliert. Zur Herstellung von 208F-iH-Ras-Zellen,  
15 die eine induzierbare Expression des H-Ras Onkogens zeigen, wurden 208F Zellen mit den Plasmiden pSVlacOras und pH $\beta$ lacNLSneo (Liu et al., Canc. Res. 52 (1992), 983-989) cotransfiziert und in Standardmedium mit 400  $\mu$ /ml G418 selektioniert. Für die Ras-Expression wurden die Zellen mit 20 mM Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG) vier Tage lang inkubiert.

20

Der MEK Inhibitor PD98059 (Dudley et al. PNAS USA 92 (1995), 7686-7689) wurde in einer Endkonzentration von 50 mM in DMSO gelöst. FE-8-Zellen wurden 2 Tage lang mit PD98059 in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M behandelt. Die ankerunabhängige Proliferation wurde  
25 semiquantitativ in Kulturen bestimmt, die auf Mikrotiterplatten beschichtet mit Poly-2-hydroxyethylmethacrylat (Poly-Hema; Sigma) gewachsen waren. 75  $\mu$ l einer Poly-Hema-Stammlösung (5 mg/ml in 95% Ethanol) wurden in die Vertiefungen gegeben und für 72 h bei 37°C trocknen gelassen. Zellsuspensionen wurden auf beschichteten Platten (1000  
30 Zellen/Vertiefung) ausgesät und das Wachstum wurde nach 5 Tagen unter Verwendung eines XTT Assay (Roche, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

## 1.2. Klonierung von differenziell exprimierten Sequenzen durch subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH)

Gesamt-RNA wurde aus subkonfluenten Kulturen wie von Chomczynski  
5 und Sacchi (Anal. Biochem. 162 (1987), 156-159) beschrieben gewonnen.  
mRNA wurde aus 1 mg Gesamt-RNA unter Verwendung des mRNA  
Separatorkit (Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA) isoliert. cDNA  
Synthese und Subtraktion wurden unter Verwendung des PCR-Select™  
Subtraktionskit (Clontech, Palo Alto, Kalifornien, USA) gemäß der  
10 Vorschrift des Herstellers mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Ein  
Driver/Tester-Volumenverhältnis von 2:12 wurde bei der ersten  
Hybridisierung verwendet. 26 Zyklen der primären PCR und 10 Zyklen der  
sekundären PCR wurden unter der Verwendung des Advantage cDNA  
Polymerase Mix (Clontech) durchgeführt. Um die Effizienz der cDNA  
15 Subtraktion zu bestimmen, wurden die Transkriptmengen des konstitutiv  
exprimierten Gens GAPDH durch RT-PCR in subtrahierten und  
unsubtrahierten Populationen von 208F RNA bzw. FE-8 RNA verglichen.  
Der Nachweis von GAPDH Sequenzen für beide Subtraktionen erforderte  
28 PCR Zyklen bei Verwendung von subtrahierter cDNA als Matrize,  
20 während zur Amplifizierung von GAPDH aus Kontroll cDNA nur 18 Zyklen  
benötigt wurden. Außerdem wurden die Mengen von Genen, für die eine  
differenzielle Expression in 208F und FE-8 Zellen bekannt ist, durch RT-PCR  
getestet. Wie erwartet war H-ras spezifische cDNA in subtrahierter  
gegenüber und unsubtrahierter FE-8 cDNA angereichert. Die Menge an  
25 Lysyloxidase cDNA war höher in subtrahierter als in unsubtrahierter 208F  
cDNA und zeigte eine Abnahme von einer geringen Menge in  
unsubtrahierter FE-8 cDNA bis zu einer nicht mehr nachweisbaren Menge  
in subtrahierter FE-8 cDNA.

30 Die subtrahierten cDNA Sequenzen wurden unter Verwendung des QIA  
Quick PCR Reinigungskit (Qiagen, Valencia, Kalifornien, USA) aufgereinigt.  
10 ng cDNA wurden in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen, Leeg, Niederlande)

durch T/A-Klonierung inseriert. Individuelle Transformanten mit cDNA Fragmenten wurden aus weißen Kolonien auf X-Gal/IPTG-Agar-Platten isoliert. Um die Qualität der Bibliothek hinsichtlich der Redundanz und Spezifität zu ermitteln, wurden 35 willkürlich gepickte cDNA Transformanten aus jeder DNA-Bibliothek isoliert und sequenziert. Die differenzielle Expression der inserierten Sequenzen wurde in Northern Blots mit 10 µg Gesamt RNA aus 208F und FE-8 Zellen analysiert.

### 1.3 Sequenzanalyse

10

Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem M13 Universalprimer unter Verwendung des BigDye-Sequenzierungskit (Perkin Elmer) gemäß der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzen wurden auf einem ABI377 Sequenziergerät bestimmt. Die Sequenzierung der cDNA Insertionen von subtrahierten Bibliotheken wurde beendet, wenn die Anzahl redundanter Sequenzen diejenige von neuen Klonen signifikant überstieg. Das Clustering erfolgte unter Verwendung der GAP4 Software (Staden Package). Sequenzhomologie-Untersuchungen erfolgten gegen die Datenbanken GenBank (nr) und Expressed Sequence Tag (dbest) unter Verwendung des BLASTN Programms bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

20

### 1.4 Hybridisierungsanalyse

Nicht redundante Plasmid-DNA Sonden aller identifizierter Fragmente wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt. Unter Verwendung von PCR-Select™ adaptorspezifischen Primern wurde eine PCR-Amplifikation mit 30 Zyklen (30 sec 94°C, 30 sec 68°C, 90 sec 72°C) durchgeführt. Die mittlere Größe der inserierten Fragmente war 800 bp. Die PCR amplifizierten Insertionen wurden auf jeweils 2 25 x 12 cm Nytran Nylonmembranen (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) geplottet. Es wurde eine Reverse Northern Analyse wie bei von Stein et al. (Nucleic

30

Acids Res. 25 (1997), 2598-2602) beschrieben durchgeführt, außer dass die folgenden Hybridisierungsbedingungen verwendet wurden: Die Vorhybridisierung der Membranen erfolgte mit 5 x Denhardt's Reagenz, 5 x SSC, 50 mM Phosphatpuffer, 0,5% SDS, 100 ng/ml tRNA bei 65°C für 3 h. Die Hybridisierung erfolgte im selben Puffer ohne Denhardt's Reagenz und 50 mM Phosphatpuffer bei 65°C für 16 h.

Für die konventionelle Northern Blot-Analyse wurden 10 µg Gesamt-RNA elektrophoretisch in 1 % Agarosegelen mit Formaldehyd aufgetrennt und in 20 x SSC auf Protran Nitrozellulosemembranen (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) gebロットet. Die cDNA Fragmente wurden unter Verwendung des Ready Prime Systems (Amersham, Braunschweig) mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert. Die Hybridisierung erfolgte in ExpressHyb Hybridisierungspuffer (Clontech) bei 68°C über Nacht. Die Membranen wurden zweimal in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 42°C für 20 min und 2 x 0,1 SSC, 0,1 % SDS bei 66°C für 30 min gewaschen und autoradiographisch analysiert.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Eigenschaften der zur Identifizierung von Ras-Transformationstargets verwendeten Zellen

Die präneoplastische Zelllinie 208F und deren malignes Ras-transformiertes Derivat FE-8 (Fig. 5a) zeigen einen nahezu diploiden Karyotyp ohne größere numerische oder strukturelle chromosomale Aberrationen (Fig. 5b). Während 208F Zellen keine spontane Transformation zeigen, sind FE-8 Zellen ankerunabhängig (Fig. 5c) und zeigen eine stark maligne Wirkung bei subkutaner Injektion in athymische Nacktmäuse oder neugeborene Ratten (Griegel et al. (1986), supra; Sers et al. (J. Cell Biol. 136 (1997), 935-944). Das 208F/FE-8 Zellsystem eignet sich somit für die Bereitstellung einer Population an transkriptionell veränderten Genen, die durch eine

permanente Ras-Signalgebung sowie durch Änderungen in der allgemeinen Genregulation hervorgerufen werden.

## 2.2 Isolierung von differenziell beim Übergang vom normalen zum transformierten Zustand exprimierten Sequenzen

cDNA-Klone, die präferentiell in normalen 208F Rattenzellen oder in transformierten FE-8 Zellen exprimierte mRNAs repräsentieren, wurden aus zwei subtrahierten cDNA-Bibliotheken gewonnen. Zur Isolierung von beim Übergang vom normalen zum transformierten Zustand herabregulierten Sequenzen (N-Klone) wurde Tester cDNA aus normalen 208F Fibroblasten und Driver cDNA aus transformierten FE-8 Zellen (Vorwärts-Subtraktion) verwendet. Um bei während der neoplastischen Transformation heraufregulierte Sequenzen (T-Klone) zu erhalten, wurde FE-8 cDNA als Tester und 208F cDNA als Driver verwendet (Rückwärts-Subtraktion). Es wurden die Nukleotidsequenzen von 1357 subtrahierten cDNA Klonen nach T/A Klonierung und bakterieller Transformation bestimmt. Dabei wurden 823 individuelle Sequenzen identifiziert (Fig. 1, 11). Um die differenzielle Expression durch unabhängige Methoden zur verifizieren, wurden subtrahierte cDNA Sequenzen unter Verwendung von Nested Adapter Primern durch PCR amplifiziert. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Hybridisierungsmembranen überführt. Jeweils zwei Membranen wurden mit radioaktiv markierten Sonden aus normalen 208F Zellen bzw. transformierten FE-8 Zellen hybridisiert (Reverse Northern Analyse, Fig. 6). Zusätzlich wurde Gesamt-RNA aus 208F und FE-8 Zellen mit Standard Northern Blots unter Verwendung einzelner cDNA Fragmenten als Sonden analysiert. Durch konventionelle Northern Analyse wurde die differenzielle Expression von 48 aus 50 willkürlich ausgewählten cDNA Fragmenten (96%) auf Reversen Northern Blots verifiziert. Außerdem wurden 193 bekannte Genfragmente, die keine eindeutigen oder gar keine Hybridisierungssignale auf Reversen Northern-Membranen ergaben, auf konventionelle Weise analysiert. Die

Ergebnisse aller Standard-Northern Blot Analysen mit Hinweis auf  
differenzielle Expression von Ras-Transformationstargets sind in Fig. 7  
gezeigt. Exprimierte Sequence-Tags und neue Sequenzen wurden nicht  
weiter analysiert, wenn die Sensitivität des Reversen Northern Blots nicht  
5 ausreichend war, um eine differenzielle Expression eindeutig zu verifizieren.  
Die Liste aller differenziellen Gene klassifiziert nach ausgewählten  
Eigenschaften ihrer Produkte ist in Fig. 2 gezeigt. Die zum Nachweis von  
Expressionsdifferenzen zwischen normalen und transformierten verwendete  
Methode erlaubt die Isolierung von stark und gering exprimierten Genen.  
10 Aufgrund des im SSH Verfahren enthaltenen Ausgleichsschritts wurde eine  
Identifizierung von stark exprimierten Transkripten (z.B. kodierend für  
Proteine des Cytoskeletts) und von mRNAs mit geringer Kopienzahl (z.B.  
kodierend für Transkriptionsfaktoren) ermöglicht. Die bei dieser  
Untersuchung identifizierten cDNA Fragmente stellen einen signifikanten  
15 Bruchteil der in den zwei Zelllinien differenziellen exprimierten Genen dar.

### 2.3 Transkriptionelle Basis für abnormes Wachstum, invasive und metastatische Eigenschaften in Ras-transformierten Zellen

20 Aus FE-8 Zellen wurde eine Anzahl von Genen gewonnen, von denen  
bereits bekannt war, daß sie in Ras- transformierten Zellen in veränderten  
mRNA-Mengen vorliegen. Die potentiellen Ras-Targets, die eine stimulierte  
oder de novo Expression aufweisen, umfassen die Gene kodierend das  
Metastase-assoziierte Glykoprotein CD44, den Transkriptionsfaktor Fra-1,  
25 das alpha-Chemokin Mob-1, die Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-3  
sowie die regulatorische leichte Kette von Myosin. Die bekannten  
herabregulierten Ras-Targets beinhalten die Gene für  $\alpha$ -Actin, Kollagen  $\alpha$ -1,  
Entaktin/Nidogen, Fibronectin, TGF $\beta$ -stimulierte Sequenz TSC36,  
Lysyloxidase, Glattmuskel-Myosin-Leichtkette (MLC)-2 und NAD-  
30 Dehydrogenase.

Das Transkriptionsmuster von Ras-transformierten Zellen zeigte eine enge Korrelation mit aggressivem Tumorverhalten. So war beispielsweise die Expression von Lamininrezeptor, MMP-1 (Collagenase), MMP-3 (Stromelysin-1), MMP-10 (Stromelysin-2) und CD44 Glykoprotein, deren Bedeutung für die Metastasierung bekannt ist, in FE-8 Zellen stimuliert. Gleichzeitig war eine große Anzahl von antiproliferativen, antiinvasiven oder antiangiogenen Genen in FE-8 Zellen reprimiert. Diese Gene kodieren für Syndecan-2, Gewebeinhibitor von Metalloproteasen (TIMP)-2, Lysyloxidase (lrg-1), Thrombospondin-1, Proteinkinase A II, das myristoylierte, alaninreiche C-Kinasesubstrat (MARCKS) und das Wachstumsarrest-spezifische Protein GAS-1.

Es wurde auch eine Verknüpfung zwischen der Ras-Onkogen vermittelten Signalgebung und der Arzneimittelresistenz gefunden basierend auf der Heraufregulierung von Genen in FE-8 Zellen, die beim Transport und der Prozessierung von cytotoxischen Arzneimitteln beteiligt sind, einschließlich des multispezifischen Anionentransporters MOAT-B, der Exopeptidase Bleomycinhydrolase und der Aldehydreduktase. Weiterhin wurden diverse Gene identifiziert, die an Signaltransduktionsprozessen für die Regulierung der mitogenen Aktivität und des Überlebens der Zelle beteiligt sind, sowie von Genen, welche die Reorganisation des Cytoskeletts, die Reaktion auf Stress, oxidative Phosphorylierung, glykolytische Energieerzeugung und Fettsäureoxidation beeinflussen (Fig. 2).

#### 3.4 Sensitivität von Ras-vermittelten transkriptionellen Änderungen auf die Inhibierung des Raf/Mek-Signaltransduktionswegs

Es ist bekannt, dass eine Anzahl von Signaleffektorproteinen mit der Haupt-Effektordomäne von Ras interagiert. Neben der Raf-Kinase, dem Haupteffektor von Ras, sind auch Raf-unabhängige Mechanismen an der Ras-vermittelten Transformation beteiligt (zum Überblick siehe Khosravi et al., Adv. Cancer. Res. 72 (1998), 57-107). Es wurde nun untersucht, in

welchem Ausmaß die Raf-Signaltransduktionskaskade stromabwärts von Ras die Gentranskription und den transformierten Phänotyp in FE-8 Zellen beeinflusst.

5 Bei Behandlung mit dem spezifischen Mek-Inhibitor PD98059 zeigten FE-8 Zellen eine normalere Morphologie ähnlich wie 208 F-Zellen (Fig. 5a) und eine signifikant verringerte Fähigkeit zur ankerunabhängigen Proliferation (Fig. 5c) trotz gleichbleibender Mengen an p21 Ras (Fig. 5d). Die Raf/Mek-Signalkaskade war blockiert, wie sich durch verringerte Mengen an  
10 Phospho-p44/42-MAPK Mengen zeigte, die von denjenigen nichtransformierten 208 F-Zellen nicht unterscheidbar waren (Fig. 5e). cDNA Arrays umfassend alle differenziell exprimierten Sequenzen, die durch Reverse Northern Analyse (Fig. 2) nachweisbar waren, wurden mit radioaktiv markierten Sonden aus RNA von unbehandelten und Inhibitor  
15 behandelten FE-8 Zellen hybridisiert. Weiterhin wurden insgesamt 77 präferentiell exprimierte bekannte Gene, die entweder auf DNA Arrays positiv oder auf Arrays nicht nachweisbar waren, durch konventionelle Northern Blot Analyse untersucht (Fig. 8a bis e). Dabei wurden 61 bekannte Transkripte identifiziert, die gegenüber einer MAP-Kinase  
20 Hemmung sensitiv waren (Fig. 3, Fig. 8a-e). Die H-Ras vermittelte Herabregulierung wurde für 36 Ttranskriptionstargets revertiert, während die Heraufregulierung von 25 Targets blockiert wurde. Die mRNA Mengen von 116 Genen oder exprimierten Sequenzen war in mit Inhibitor behandelten FE-8 Zellen nicht beeinflusst.

25

### 3.5 Ras Isoform-spezifische Genexpressionsprofile

Die Onkogene H-Ras, K-Ras und N-Ras und ihre Produkte ähneln sich in Struktur und Funktion. Die Ras-Proteine unterscheiden sich jedoch  
30 erheblich in der Aminosäurezusammensetzung des C-Terminus, dem Expressionsmuster und ihrer posttranslationalen Modifikation (zum Überblick siehe Malumbres und Pellicer, *Frontiers in Biosciences* 3 (1998),



887-912). Weiterhin sind einzelne Isoformen in unterschiedlichen Krebsarten bevorzugt mutiert (Bos, *Canc. Res.* 49 (1998), 4682-4689).

5 Um herauszufinden, auf welche Weise die beiden anderen Ras Isoformen die Transkription von H-Ras Targetgenen beeinflusst, wurden 208F Rattenzelllinien hergestellt, welche das aktivierte K-Ras bzw. N-Ras Gen exprimieren. Diese Zelllinien zeigten ähnliche Eigenschaften in der neoplastischen Transformation wie FE-8 Zellen (Fig. 9). Radioaktiv markierte cDNA Sonden aus 208F Zellen transformiert durch mutiertes K-Ras bzw. N-Ras wurden mit den die H-Ras transformationssensitiven Sequenzen (n = 233) enthaltenden cDNA Arrays hybridisiert. Die Ergebnisse einer Reversen Northern Analyse wurden durch konventionellen Northern Blot verifiziert. Weiterhin wurden 30 Gene mit geringer Expression auf Northern Blots analysiert (Fig. 8f bis i). Etwa 90% aller gegenüber einer H-Ras Transformation sensitiven Sequenzen zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster in Zellen, die durch die beiden mutierten Ras Isoformen transformiert worden waren. Die Mengen von 26 cDNA Fragmenten zeigten jedoch deutliche Unterschiede (Fig. 4, Fig. 8f-e). Es wurden mehr spezifische H-Ras Targets als K-Ras oder N-Ras Targets gefunden.

20

Der hohe Grad an Ähnlichkeit der Targetgene in drei unabhängigen transfizierten Zelllinien, welche verschiedene Ras-Isoformen exprimieren, zeigt, dass die transkriptionellen Änderungen in hohem Maße reproduzierbar sind und nicht auf willkürlichen Unterschieden zwischen den Zelllinien beruhen. Um Zellen eines unterschiedlichen Gewebetyps zu untersuchen, wurde eine willkürlich ausgewählte Subklasse von Targetgenen von mit s transformierten Rattenovarien-Oberflächenepithelzellen analysiert (Fig. 10, links). Die transkriptionellen Änderungen in FE-8 und K-Ras transformierten ROSE-Zellen waren sehr ähnlich. Außerdem waren die meisten der für FE-8 Zellen spezifischen transkriptionellen Änderungen in 208F-Zellen reproduzierbar, die mit einem

30

IPTG induzierbaren H-Ras Gen transformiert worden waren (Fig. 10, rechts).

### Ansprüche

1. Nukleinsäure,  
5       dadurch gekennzeichnet,  
      dass sie eine differenzielle Expression in Tumorzellen und normalen  
      Zellen zeigt, umfassend
  - (a) eine der in Fig. 11 gezeigten Nukleinsäuresequenzen, mit  
10       Ausnahme der Sequenzen N5, N9, N15, N18, N52, N132,  
      N159, N179, T26, T51, T55, T56, T57 und T99,
  - (b) Teilsequenzen davon mit einer Länge von mindestens 50,  
      vorzugsweise mindestens 100 und besonders bevorzugt  
      mindestens 200 Nukleotiden,
  - (c) eine mit einer Sequenz aus (a) oder/und (b) unter stringenden  
15       Bedingungen hybridisierende Sequenz, oder/und
  - (d) eine zu einer Sequenz aus (a), (b) oder/und (c) komplementäre  
      Sequenz.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1,  
20       dadurch gekennzeichnet,  
      dass die Tumorzellen aus H-Ras, N-Ras und K-Ras transformierten  
      Ratten-Fibroblasten ausgewählt sind.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2,  
25       dadurch gekennzeichnet,  
      dass die Normalzellen aus 208F Rattenfibroblasten ausgewählt sind.
4. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
30       dadurch gekennzeichnet,  
      dass sie eine erhöhte Expression in einer Ras-transformierten Zelllinie  
      im Vergleich zu einer nichttransformierten Zelllinie zeigt oder in eine  
      Ras-transformierten Zelllinie de novo exprimiert ist.

5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass ihre Expression in Ras transformierten Zellen herabreguliert ist.
6. Nukleinsäure nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass sie eine der Sequenzen N1-N297 gemäß Fig. 11 oder eine  
damit unter stringenten Bedingungen hybridisierende Sequenz,  
insbesondere eine der korrespondierenden humanen Sequenzen  
gemäß Fig. 12 umfasst.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6,  
ausgewählt aus den in der Ratte als mRNA noch nicht beschriebenen  
Sequenzen:

N100, N103, N104, N105, N106, N107, N109, N110, N111, N112,  
N113, N114, N115, N116, N117, N118, N12, N120, N121, N122, N124, N125, N126,  
N127, N128, N129, N13, N130, N131, N133, N134, N135, N136, N137, N138, N139,  
N14, N140, N141, N143, N144, N145, N146, N147, N148, N149, N150, N151, N152,  
N153, N154, N156, N157, N158, N16, N160, N161, N162, N163, N164, N165, N166,  
N167, N168, N169, N17, N170, N171, N172, N173, N174, N175, N176, N177, N178,  
N18, N180, N181, N182, N183, N184, N185, N186, N187, N188, N189, N19, N190,  
N191, N192, N193, N194, N195, N196, N197, N198, N199, N2, N20, N201, N202,  
N203, N204, N205, N206, N207, N208, N209, N21, N210, N211, N212, N213, N214,  
N215, N216, N217, N218, N219, N22, N220, N221, N222, N223, N224, N225, N226,  
N227, N228, N229, N23, N230, N231, N232, N234, N236, N237, N238, N239, N24,  
N240, N241, N242, N244, N246, N247, N248, N249, N25, N250, N251, N252, N253,  
N254, N255, N256, N257, N258, N259, N260, N261, N262, N263, N264, N265,  
N267, N268, N269, N270, N271, N272, N273, N274, N275, N276, N277, N278,  
N279, N28, N280, N281, N282, N283, N284, N285, N286, N287, N288, N289, N29,  
N290, N291, N292, N293, N294, N295, N296, N297, N30, N32, N35, N38, N4, N44,  
N46, N51, N55, N56, N57, N59, N60, N62, N64, N65, N68, N69, N71, N73, N74,  
N75, N76, N77, N78, N79, N80, N81, N82, N84, N86, N87, N88, N89, N9, N90, N91,  
N92, N93, N94, N96, N97, N98, N99

8. Nukleinsäure nach Anspruch 6 ausgewählt aus Sequenzen, für die in Modellorganismen wie Maus, Huhn, Xenopus, C. elegans, Drosophila homologe Sequenzen beschrieben sind, die aber nicht im Menschen bekannt sind:

N103, N105, N112, N113, N115, N116, N121, N127, N128, N13, N14, N151, N16, N163, N164, N17, N182, N184, N185, N189, N19, N199, N2, N20, N212, N225, N241, N249, N252, N257, N264, N269, N289, N29, N296, N30, N38, N4, N56, N57, N59, N60, N64, N65, N68, N69, N74, N9

9. Nukleinsäure nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,

dass sie eine der Sequenzen T1-T235 gemäß Fig. 11 oder eine damit unter stringenten Bedingungen hybridisierende Sequenz, insbesondere eine der korrespondierenden humanen Sequenzen gemäß Fig. 12 umfasst.

10. Nukleinsäure nach Anspruch 9 ausgewählt aus den in der Ratte als mRNA noch nicht beschriebenen Sequenzen:

T1, T100, T101, T102, T103, T104, T105, T106, T107, T108, T109, T110, T111, T112, T113, T114, T115, T116, T118, T119, T12, T120, T121, T122, T123, T124, T125, T126, T127, T128, T129, T130, T131, T134, T135, T136, T137, T14, T140, T141, T142, T144, T145, T146, T147, T148, T149, T150, T151, T152, T153, T154, T155, T156, T157, T158, T159, T160, T163, T164, T165, T168, T169, T17, T170, T171, T172, T173, T174, T175, T177, T178, T179, T18, T180, T181, T182, T183, T184, T185, T186, T187, T188, T189, T19, T190, T191, T192, T194, T195, T196, T197, T198, T199, T2, T20, T200, T201, T202, T203, T204, T205, T206, T207, T208, T209, T210, T211, T212, T213, T214, T215, T216, T217, T218, T219, T220, T221, T222, T223, T224, T225, T226, T227, T228, T229, T230, T231, T232, T233, T234, T235, T236, T237, T238, T239, T24, T241, T242, T243, T244, T245, T247, T248, T249, T25, T250, T251, T252, T253, T27, T28, T29, T3, T31, T32, T34, T35, T36, T37, T39, T4, T40, T42, T46, T48, T49, T50, T52, T58, T59, T60, T61, T62, T63, T65, T66, T68, T69, T7, T70, T73, T76, T77, T78, T79, T8, T81, T82, T83, T84, T85, T86, T87, T88, T9, T90, T91, T92, T94, T95, T96, T97, T99

11. Nukleinsäure nach Anspruch 9, ausgewählt aus Sequenzen, für die in Modellorganismen wie Maus, Huhn, Xenopus, C.elegans, Drosophila homologe Sequenzen beschrieben sind, die aber nicht im Mensch bekannt sind:

T1, T118, T121, T122, T137, T142, T18, T2, T20, T222, T232, T238, T25, T3, T31, T32, T35, T37, T49, T50, T59, T60, T63, T65, T69, T7, T73, T8,

12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Homologie zu menschlichen Sequenzen, insbesondere menschlichen ESTs oder EST-Clustern aufweist.

13. Nukleinsäure nach Anspruch 12 ausgewählt aus

N1, N10, N101, N102, N103, N104, N108, N109, N11, N112, N116, N12, N121, N122, N125, N126, N128, N129, N13, N131, N132, N134, N136, N137, N14, N142, N144, N148, N149, N151, N152, N154, N156, N158, N159, N160, N163, N165, N17, N175, N18, N180, N181, N182, N183, N186, N187, N188, N189, N192, N196, N198, N199, N20, N202, N204, N205, N207, N209, N21, N212, N213, N215, N218, N22, N228, N234, N235, N238, N242, N243, N248, N249, N250, N252, N253, N255, N256, N257, N26, N260, N261, N263, N264, N266, N267, N270, N271, N275, N28, N280, N283, N289, N29, N294, N3, N30, N31, N32, N34, N35, N36, N38, N39, N4, N40, N42, N43, N44, N45, N46, N48, N49, N5, N50, N51, N55, N58, N59, N61, N62, N65, N7, N70, N71, N74, N75, N77, N78, N79, N80, N81, N82, N85, N89, N92, T10, T100, T103, T105, T109, T11, T111, T116, T117, T118, T119, T120, T121, T124, T125, T129, T132, T133, T137, T138, T139, T14, T141, T143, T144, T146, T147, T148, T15, T153, T156, T159, T16, T160, T162, T163, T166, T17, T170, T172, T174, T175, T176, T182, T193, T185, T186, T188, T189, T19, T191, T192, T193, T196, T2, T20, T202, T204, T205, T208, T21, T211, T212, T215, T216, T217, T219, T222, T223, T224, T225, T226, T227, T230, T232, T235, T237, T238, T239, T240, T243, T244, T245, T25, T250, T251, T253, T27, T3, T31, T34, T35, T36, T37, T38, T40, T42, T43, T44, T45, T47, T48, T49, T50, T54, T58, T59, T6, T60, T61, T62, T64, T66, T67, T68, T69, T72, T73, T75, T76, T80, T82, T86, T88, T89, T9, T94, T96, T98,

- 5     14.    Nukleinsäure nach Anspruch 13,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         dass sie ein menschliches Gen, eine menschliche cDNA oder eine  
         Teilsequenz davon darstellt und dass das entsprechende  
         rattenhomologe Gen eine differenzielle Expression in Tumor- und  
10       normalen Zellen zeigt.
15.    Nukleinsäure nach Anspruch 14,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         dass sie eine der in Figur 12 gezeigten Sequenzen umfasst.
- 15       16.    Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 15,  
         dadurch gekennzeichnet,  
         dass sie als Oligonukleotid oder als cDNA auf einem Array  
         angeordnet ist.
- 20       17.    Verwendung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 16  
         oder eines davon kodierten Polypeptids als Target für diagnostische  
         oder therapeutische Zwecke oder in einem Screening-Verfahren.
- 25       18.    Verwendung nach Anspruch 17 zur Herstellung eines Mittels für die  
         Tumordiagnostik oder Tumorthapie.
19.    Verwendung nach Anspruch 17 oder 18,  
         dadurch gekennzeichnet,  
30       dass die Expression der Nukleinsäure moduliert wird.

20. Verwendung nach Anspruch 19,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Modulation eine gentherapeutische Verarbeitung der  
Nukleinsäure umfasst.

5

21. Verwendung nach Anspruch 19,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Modulation eine Verabreichung von Antisense-RNA oder  
Ribozymen umfasst.

10

22. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Menge oder/und Lokalisierung des von der Nukleinsäure  
kodierten Polypeptids moduliert wird.

15

23. Verwendung nach Anspruch 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Modulation eine Verabreichung des Polypeptids oder eines  
Aktivators davon umfasst.

20

24. Verwendung nach Anspruch 22,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass die Modulation eine Verabreichung von gegen das Polypeptid  
gerichteten Antikörpern oder Inhibitoren des Polypeptids umfasst.

25

25. Verfahren zum Testen des Einflusses von Wirksubstanzen auf die  
Genexpression,  
dadurch gekennzeichnet,  
dass eine Wirksubstanz einer Zelllinie zugegeben wird, RNA aus der  
Zelllinie isoliert wird, die RNA markiert wird, anschließend auf ein  
Array hybridisiert wird und danach das Genexpressionsprofil der  
Zelllinie gewonnen wird.

30



26. Verfahren nach Anspruch 25,  
dadurch gekennzeichnet,

dass das Genexpressionsprofil der mit der Wirksubstanz behandelten Zelllinie (a) mit dem Genexpressionsprofil einer nicht mit der Wirksubstanz behandelten Zelllinie oder/und (b) mit dem Genexpressionsprofil einer mit der Wirksubstanz behandelten, aber unterschiedlichen Zelllinie verglichen wird.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Nukleinsäuresequenzen, die in Tumor- und  
5 Normalzellen differenziell exprimiert werden.

10

my/ANM/21914PWO-31.01.2001

# SEQUENZPROTOKOLL

JC978 U.S. PRO  
09/930213  
01/31/01

<110> metaGen

<120> Nachweis von differenzieller Genexpression

<130> 21914PDE

<140> 100 04 102.7-41

<141> 2000-01-31

<150> 885

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 459

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```
<400> 1
naagcccttc atcgatttat agagcttttc agagtgatgg tttctcgagc agaaattgac 60
atgttggata tccgggcaca cttcaagaga ctctatggaa agtctctgta ctcgttcacc 120
aagggtgaca catctggaga ctacaggaaa gtactgcttg ttctctgtgg aggagatgat 180
taaaataaaa atcccagaag gacaggagga ttctcaacac tttgaatttt tttaacttca 240
tttttctaca ctgctattat cattatctca gaatgcttat ttccaactaa aacgcctaca 300
gctgctctct aggaatatag actgtctgta ttattattca cctatnatta ggtccattat 360
ggatgcttta aagctgtact tggcatttcc aaagcntata aggttataat gggaggtttt 420
naaagtagga nttaaatatg tattccctgt tttttaaaa 459
```

<210> 2

<211> 352

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```
<400> 2
catggcatgc agaggatcta caaaatgggt tcaccaggcc tgtctacaac gctgggtgga 60
tgaaaagcaa acaggaaaaca gtacagccag agtggcatgt cctcagtga atgctgaata 120
cctaatagtt ttccaaaaat tgggtccagt ggtttacgtc ttggatcttg cagatagact 180
gatctcaaaa gcctgtccat ttgctgcagc aggaataatg gtcggctcta tctattggac 240
agctgtgact tatggagcag tgacagtgat gcaggttgta ggtcataaag aaggtctgga 300
tgttatggag agagctgac ctttattcct ttttaatttg gacttcttac ta 352
```

<210> 3

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```
<400> 3
ggcacgaggg atagggctcg gctggttttc acagggtgggt tcttggggcaa gatggggcca 60
ctttcaagta ttctgggac aagttcacgt gctttgaatt tgtattgttg caattttctg 120
agctcctcag cctccagctc tgctgtactt ttgcaggtea cagcccgctc acggtgtttg 180
gtttgcagta caggagtctg tgggtctctg caaatcttgg tcacagaaga tttggagggg 240
aacagggttaa tatcatcctt cttggctcct caaatgatat ctgttagggg ttctgtttatg 300
gaagtcttca acttgctgtg caagggtggg acatnatgta gaaactgttt cancaaatgt 360
```

<210> 4

<211> 433

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```
<400> 4
gactccttca cgtcaggctc aggttccatg ggaggacgaa gcagtggacg cattgtgggc 60
```